

Über die in der Zoologischen Station zu Neapel gebräuchlichen Methoden zur mikroskopischen Untersuchung.

Von

Dr. Paul Mayer.

Die folgenden Blätter sollen einen kurzen Bericht über die Methodik histologischer Untersuchungen liefern, so weit sich dieselbe in der Zoologischen Station während des kurzen Zeitraumes ihres Bestehens bereits hat entwickeln können. Die große Mannigfaltigkeit der marinen Formen, denen gegenüber die Hilfsmittel der Histologen von Fach, weil fast immer nur für die wenigen Versuchsobjecte aus dem Bereiche der höheren Thiere erdacht, oft genug im Stiche lassen, macht ohne Zweifel eine solche Methodik nothwendig. Nach Lage der Dinge erscheint dabei die Station nur als die Verbreiterin der Anschauungen, welche theils auf Anregungen der auswärtigen Forscher während eines vorübergehenden Aufenthaltes in ihren Räumen, theils auf den Arbeiten ihrer ständigen Beamten beruhen, jedenfalls aber von den Letzteren gepflegt, weiter fortgebildet und in der beständigen Praxis auf ihre Richtigkeit geprüft worden sind. Wie sich darum die Frage nach dem geistigen Eigenthume hier noch weniger denn anderwärts in allen Fällen zu einer befriedigenden Lösung bringen lässt, so erklärt sich zugleich daraus die Lückenhaftigkeit der Mittheilungen und die ungleiche Berücksichtigung, welche die einzelnen Thierstämme erfahren haben. Immerhin aber wird dieser erste Versuch zu einer geordneten Zusammenstellung der vielfach in der Litteratur zerstreuten oder lediglich von mündlicher Überlieferung getragenen Angaben, wenn er auch nur die Veranlassung zu eingehenderen Veröffentlichungen bietet, nicht gänzlich des Nutzens entbehren.

Conservierungsmethoden.

1) Von Methoden zur Conservirung behufs histologischer Untersuchung gelangen in der Zool. Station eine ganze Reihe, darunter einige bisher noch nicht veröffentlichte, zur Anwendung. In erster Linie bedient man sich der Kleinenberg'schen Pikrinschwefelsäure¹, die für die meisten niederen Seethiere unersetzlich ist. Sie bietet den Vortheil, dass sowohl die den Thieren äußerlich anhaftenden Mengen Seewassers als auch die in den Geweben enthaltenen Salze zum größten Theile verdrängt und durch eine Flüssigkeit ersetzt werden, welche sich durch Alkohol völlig entfernen lässt. Mit Osmium- und Chromlösungen ist dies bekanntlich nicht der Fall, vielmehr kommt hier noch der in den Geweben erzeugte anorganische Niederschlag hinzu und wirkt unter Umständen bei der Tinction störend. Nothwendig ist es selbstredend, viel Flüssigkeit in Anwendung zu bringen; dies gilt namentlich dann, wenn Thiere mit großer Leibeshöhle in toto zu conserviren sind. Im Allgemeinen tödtet die Pikrinschwefelsäure ungemein rasch² und bringt zugleich bei kleineren Organismen die Zellen zu fast augenblicklicher Erstarrung, so dass sie nach dieser Richtung hin entschieden der Chromsäure und ihren Salzen vorzuziehen ist. Doch dringt auch sie, obwohl sie verhältnismäßig leicht diffundirt, nur schwierig durch dickere Chitinmembranen durch. Es ist daher, um wirklich brauchbare Präparate von z. B. größeren Isopoden, Insecten u. s. w. zu erhalten, unerlässlich, den Körper mit der Schere ganz zu öffnen und die Leibeshöhle sofort mit einer Pipette voll Pikrinschwefelsäure aus-

¹ Sie wird dargestellt, indem man zu 100 Raumtheilen einer kalt gesättigten Lösung von Pikrinsäure in Wasser 2 Raumtheile concentrirter Schwefelsäure hinzufügt und die vom Niederschlage abfiltrirte Flüssigkeit mit dem 3fachen an Wasser verdünnt. Für Arthropoden wende ich das Säuregemisch unverdünnt an.

² Obwohl für gewöhnlich auch die höheren Crustaceen sehr schnell darin sterben, so macht doch *Artemia salina* L. eine bemerkenswerthe Ausnahme. Von denjenigen Exemplaren, welche mir Prof. CARLO EMERY aus Cagliari zu schicken die Güte hatte, lebten einige in der concentrirten Pikrinschwefelsäure fast eine Stunde lang und ergaben natürlich auch histologisch wenig brauchbare Präparate. Mäßig erwärmte Säure hingegen tödtete sie sofort und drang auch so schnell in das Innere ein, dass ein allmähliches Absterben der Gewebe nicht statthaben konnte. Es wäre interessant zu erfahren, ob diese Artemien nach längerem Leben in weniger salzhaltigem Wasser eine durchlässigere Haut erhalten würden, oder ob nicht auch *Apus* und *Branchipus* sich gegen Pikrinschwefelsäure unverhältnismäßig resistent beweisen. Mir ist die erwähnte Erscheinung um so auffälliger gewesen, als die Zellen der Kiemenwandungen bei anderen gleich großen Crustaceen ungemein geschwind erstarren, die Thiere also gewissermaßen ersticken.

zuspritzen, damit die gerinnbaren Theile des Blutes nicht Zeit gewinnen, sich auf die unter ihnen befindlichen Organe niederzuschlagen und sie mit einander zu verkleben. Überhaupt ist aus gleichem Grunde die Flüssigkeit so lange zu wechseln, als noch Trübungen in ihr entstehen, und erst in völlig klarer Säure dürfen die Objecte längere Zeit verweilen. Gerade auf letzteren Punkt kann nicht genug hingewiesen werden, denn eben in der Vernachlässigung dieser scheinbar selbstverständlichen Maßregel liegt hier sowohl wie bei anderen Conservierungsflüssigkeiten der Schlüssel zu den häufig so wenig befriedigenden Resultaten, welche nur zu gern der Methode in die Schuhe geschoben werden. Wie lange übrigens der Aufenthalt in der Säure dauern darf, hängt von der Beschaffenheit der Gewebe resp. der ganzen Thiere ab. Meist genügen einige Stunden; bei sehr wasserreichen und großen Stücken ist längere Zeit und dann und wann auch ein Bewegen der Flüssigkeit erforderlich. Manchmal scheint auch eine tagelange Einwirkung nicht schädlich zu sein¹.

Während in Chrommischungen die Gewebe vielfach direct schnittfähig werden, findet durch die Pikrinschwefelsäure wohl eine Abtödtung der Zellen, aber nicht eine wirkliche Härtung statt. Zum Theil wird diese Erscheinung sicherlich darin begründet sein, dass es nur zu einer Gerinnung des protoplasmatischen Inhaltes, nicht zu einer bleibenden Einlagerung anorganischer Bestandtheile kommt²; zum Theil auch wird die Schwefelsäure, indem sie das Bindegewebe zum Quellen bringt, daran Schuld sein. Hier hat also der Alkohol durch Wasserentziehung zu wirken. Die Folge davon ist, dass durch ihn bei recht weichen und zarten Objecten, welche bis dahin ihre Form bewahrten, eine unliebsame Schrumpfung eintreten kann. Am besten thut man daher, Larven und andere kleine pelagische Thiere mit dünnen Wandungen entweder mit der Pipette oder mit einer Schaufel in den Alkohol (von 70 %) zu übertragen, so dass sie einstweilen, da sie wegen ihrer Schwere rasch zu Boden sinken, noch in ihrem früheren Medium bleiben. Wenn dieses nach einigen Minuten in den Alkohol diffundirt ist, so befördert man sie auf die angegebene Weise in frischen Alkohol und muss hierbei darauf achten, dass die einzelnen Thiere nicht mit einander in Berührung gerathen, da sie mitunter leicht zusammen-

¹ Ganz junge Larven von *Toxopneustes* z. B., die durch ein Verschen über 5 Tage in der Säure gelegen hatten, ergaben noch leidliche Präparate.

² Abgesehen von den Fällen, in denen der kohlensaure Kalk der Gewebe sich in Gips umsetzt. Indessen gerade dann wird eher eine Erweichung, als eine Härtung erfolgen.

backen. Bei größeren Objecten sind diese Vorsichtsmaßregeln natürlich nicht erforderlich, indessen kann hier leicht eine Abplattung des noch weichen Körpers stattfinden, der man durch öfteres Umlegen oder Wälzen begegnet. So lange noch die Abgabe von wässriger Flüssigkeit fort dauert, wird man den Alkohol häufig zu wechseln oder wenigstens zu bewegen haben, damit sich nicht am Boden des Gefäßes eine zur Maceration Veranlassung gebende Schicht bilden könne. KLEINENBERG empfiehlt zwar, schon bald 90 %igen Alkohol anzuwenden, doch habe ich keinerlei Vortheil davon gefunden und bewahre auch die Präparate endgültig in dem 70 %igen Alkohol auf. Unbedingt nothwendig ist es aber, die anfangs noch lebhaft gelb gefärbten Objecte völlig weiß werden zu lassen, die Flüssigkeit also so oft zu erneuern, als sie noch Spuren von Pikrinsäure zeigt. Erst wenn die letztere ganz und gar ausgezogen¹ ist, darf man den Conservirungsprozess als beendet ansehen.

Aus dem Gesagten ist leicht ersichtlich, dass die Vorzüge der Pikrinschwefelsäure darin bestehen, dass sie die Gewebe rasch abtödtet, dass sie verhältnismäßig schnell auch in das Innere dicker Schichten eindringt und dass sie hinterher sich gänzlich wieder aus den Objecten entfernen lässt. Bei den Seethieren spült sie außerdem noch die Salze des Meerwassers fort. Ihre Anwendung verbietet sich natürlich dort, wo es darauf ankommt, etwa vorhandene Kalktheile in den Organismen ungelöst zu bewahren; indessen auch dann, wenn die Erhaltung derselben in ihrer ursprünglichen Form nicht gefordert wird, empfiehlt sie sich bei der Anwesenheit von vielem Calciumcarbonat (also z. B. bei Echinodermen) nur wenig, weil sich durch ihren Einfluss viel Gips bildet und in großen Krystallen mitten in den Geweben niederschlägt. Bei Wirbelthieren darf sie, weil die in ihr enthaltene Schwefelsäure Bindegewebe zur Quellung bringt, nur unter Berücksichtigung dieser ihrer Eigenschaft in Gebrauch gezogen werden. Wie mir Prof. EMERY

¹ Sie verharrt in einzelnen Geweben oft merkwürdig lange. Aus dickeren Chitinschichten ist sie mitunter selbst nach Wochen noch nicht entfernt, so dass nichts übrig bleibt, als solche Stücke von den bereits weiß gewordenen zu trennen. Da übrigens die reine Pikrinsäure stets sehr viel hartnäckiger ist, als ihre Verbindung mit Schwefelsäure, so liegt es nahe, in den angegebenen Fällen an eine Dissoziation zu glauben. Versuche zur Orientirung darüber, wie sich beim Entsäuern mittels Alkohol die beiden Bestandtheile der Kleinenberg'schen Säure zu einander stellen, sind noch zu machen und ergeben vielleicht interessante Aufschlüsse über die verschiedenen Gewebe. Sicher ist nur, dass heißer oder auch nur warmer Alkohol die Extraction viel rascher bewerkstelligt, als es derjenige von gewöhnlicher Temperatur thut.

mittheilt, eignet sie sich indessen für Wirbelthierembryonen und für Fische gut, nur darf man die Objecte nicht länger als 3—4 Stunden in ihr liegen lassen. KLEINENBERG hat übrigens neuerdings, um den Quellungen entgegenzuarbeiten, Kreosot aus Buchenholztheer dem Säuregemisch zugesetzt und versichert, damit gute Resultate erzielt zu haben. — In eigenthümlicher Weise scheint die Pikrinschwefelsäure endlich auf die parasitischen Crustaceen einzuwirken. Während sie nämlich im Allgemeinen für die Krebse wohl das beste Conservierungsmittel darstellt, bewirkt sie in jenen meist Quellungen, Loslösungen ganzer Gewebspartien u. s. w., so dass sie, wie auch FRAISSE¹ schreibt, am besten vermieden wird. Der Grund für diese Erscheinung liegt natürlich in dem histologischen Verhalten der genannten Parasiten, welche darin mitunter ganz enorm von den normalen Vertretern ihrer Gruppen abweichen und auch mit anderen Reagentien meist nur ungenügende Präparate liefern. Näheres vermag ich jedoch leider nicht anzugeben und habe auch in der Litteratur außer gelegentlichen Bemerkungen darüber nichts verzeichnet gefunden².

2) Um einem der eben erwähnten Übelstände, nämlich der lästigen Bildung von Gipskrystallen abzuhelfen, habe ich an Stelle der Pikrinschwefelsäure die Pikrinsalzsäure oder Pikrinsalpetersäure zuweilen mit Erfolg verwendet. Beide Gemische³ wirken ähnlich dem erstgenannten, leiden aber, wie mir KLEINENBERG mittheilt und wie ich auch selbst gefunden habe, an dem Übelstande, dass sich die gelbe Färbung bei dickeren Gewebsstücken schwieriger ausziehen lässt, als es bei der Pikrinschwefelsäure der Fall ist. Im Allgemeinen verdient also diese entschieden den Vorzug.

3) In einem gewissen Gegensatze zu der Conservirung mit Pikrinschwefelsäure steht diejenige mit Alkohol. Letztere nämlich bewirkt,

¹ FRAISSE, P., *Entoniscus Cavolinii* n. sp. Arbeiten zoolog. zootom. Institut. Würzburg 1877—78, IV, p. 353.

² Zweifellos ist bei sehr vielen dieser Parasiten ein oder das andere Organ noch in langsamen phylogenetischen Schwunde begriffen, würde also histologisch besonders interessant sein. Nur gestattet das vergleichsweise doch immer spärliche Material die Untersuchung gerade dieses Punktes wohl kaum, zumal das Chitin die Anwendung mancher Reagentien erschwert.

³ Ich bereite sie analog der Pikrinschwefelsäure, nehme aber statt der 2 Raumtheile Schwefelsäure 8 Raumtheile reiner Salzsäure von 25% HCl oder 5 Raumtheile reiner Salpetersäure von 25% N₂O₅. Die Wirkung der Säuregemische ist auch bei Gegenwart von vielem Kalk eine rapide, aber gerade darum bewirkt die sich entwickelnde Kohlensäure oft mechanische Verletzungen der Gewebe, so dass in manchen Fällen doch die Chromsäure den Vorzug verdient, welche ohnehin eine Collabirung leichter verhindert.

obwohl gewöhnlich bei starkem Alkohol die Tödtung eine rasche ist, bei irgend dickwandigen, namentlich mit Chitinnembranen versehenen Thieren eine mehr oder weniger starke Maceration der Innenpartien, die zuweilen sogar zu faulen beginnen. So gut diese Thatsache den Meisten bekannt ist, so wird ihr doch nicht immer Rechnung getragen, namentlich von Seiten derjenigen Forscher, welche bei Reisen an die Seeküsten sich neben ihren Hauptarbeiten auch das Sammeln für ihre Museen angelegen sein lassen. In gleicher Weise laufen noch oft bei der Verwaltung der Zool. Station Bestellungen auf Thiere ein, die zur Zergliederung in den Cursen für Studirende zu dienen haben und doch einfach in Alkohol conservirt werden sollen. In vielen Fällen ist diese Methode gewiss die schlechteste von allen. Um wieder die Crustaceen als Beispiel anzuführen, so möchte ich erwähnen, dass sie selbst für die Amphipoden und Isopoden nicht passt, weil die Organe durch die in der Leibesflüssigkeit beim allmählichen Eindringen des Alkohols entstehenden Niederschläge mit einander verlöthet werden und bei nachherigem Aufweichen in Wasser oft nicht einmal mehr eine Trennung durch geschicktere Hände, als es die eines Studirenden sind, gestatten. Weniger beachtet dürfte der Umstand sein, dass bei Seethieren die directe Conservirung in starkem Alkohol (von 70 oder 90 %) für histologische Zwecke auch darum nachtheilig ist, weil sie die meisten Salze des anhaftenden Meerwassers auf der Außenfläche der Objecte fixirt und so manchmal das Eindringen des Alkohols unnöthig erschwert. Handelt es sich dann später noch darum, das Thier in toto zu färben, so werden zwar bei Anwendung wässriger Tinctionsmittel, wie Carmin oder Pikrocarmin, die Präcipitate wieder gelöst und haben sich daher bis jetzt wie es scheint der Beobachtung gänzlich entzogen; nimmt man aber alkoholische Lösungen, so färben sie sich vielfach mit und verhindern auch eine brauchbare Tinction der inneren Körpertheile. Mir ist dieser Umstand zwar früher schon hier und da bei der Anwendung der Kleinenberg'schen Hämatoxylinlösung aufgefallen, indessen erst dann recht deutlich geworden, als ich mit Cochenilletinctur (siehe unten Nr. 13) zu operiren begann. Bei dieser nämlich kann es vorkommen, dass sich in Folge des Vorhandenseins von Krystallen aus dem Meerwasser auf der Außenfläche der mit ihnen besetzten Organismen aus der Cochenille eine graugrüne Masse¹ niederschlägt, welche die Präparate

¹ Auch ein mit destillirtem Wasser gewonnener Auszug aus Cochenille setzt nach dem Vermischen mit Seewasser solche Massen ab. Sie bestehen aus einer Verbindung des Farbstoffes mit den Kalk- und Magnesiumsalzen.

oft ganz überzieht und unbrauchbar macht. Ich lasse daher, um diesem Übelstande zu begegnen, die nur in Alkohol conservirten Thiere, namentlich wenn sie aus fremden Museen stammen, einige Stunden in saurem Alkohol (1—10 Theile Salzsäure auf 1000 Theile 70 %igen Alkohols) liegen und erhalte dann nach sorgfältiger Entsäuerung meist auch befriedigende Färbungen.

4) Der eben erwähnte Umstand hat mich dazu geführt, Conservierungsversuche mit saurem Alkohol anzustellen. Ich habe sowohl Salzsäure als auch Salpetersäure in 70- oder 90 %igem Alkohol erprobt und gefunden, dass im Allgemeinen der stärkere Alkohol und die erstgenannte Säure vorzuziehen sind. Am liebsten verwende ich ein Gemisch von 3 Raumtheilen Säure und 97 Raumtheilen Alkohol und lasse die Objecte nur so lange Zeit darin, bis ich bei öfterem Umschütteln eine völlige Durchdringung derselben erreicht zu haben glaube. Da ich vorher in dem Alkohol eine kleine Menge Pikrinsäure aufgelöst habe, so kann ich ähnlich wie bei der Pikrinschwefelsäure beim nachherigen Entsäuern mit reinem 90 %igem Alkohol an dessen Farbe beurtheilen, wie weit der Prozess gediehen ist. Ein aufmerksames Studium nun der solchergestalt gewonnenen und in verschiedener Weise tingirten Präparate hat mir gezeigt, dass bei subtilen Objecten (Auricularien, Tornarien u. s. w.) der angesäuerte Alkohol zwar dem reinen unbedingt vorzuziehen ist, indessen hinter der Pikrinschwefelsäure eben so sehr zurücksteht, also wohl nur für gröbere Objecte Verwendung finden darf. Da er übrigens noch schneller tödtet, als reiner Alkohol und außerdem die Bildung der Niederschläge, welche mitunter das ganze Präparat entstellen, verhindert, so ist für die Schaustücke in Museen die Conservirung in der angedeuteten Weise sehr zu empfehlen. Zu erwähnen ist jedoch, dass das Gemisch nach einiger Zeit merklich an Wirkung verliert, da sich auf Kosten der Säure ätherische Verbindungen bilden.

5) In einzelnen Fällen habe ich namentlich bei Arthropoden mit allen gewöhnlich in Gebrauch kommenden Mitteln eine rasche Tödtung nicht erzielen können. Ich habe mich dann mit Vortheil des kochenden absoluten Alkohols bedient, der in der richtigen Weise angewandt blitzschnell wirkt. Für Tracheaten, deren vergleichsweise trockenes Chitin bekanntlich viel weniger durchlässig ist als das stets durchtränkte der Crustaceen, bietet ohnehin der kochende Alkohol häufig das einzige Mittel, an einem nicht geöffneten Thiere wenigstens die Hautgewebe gut conservirt zu erhalten, da schon kalter Alkohol meist viel zu langsam eindringt.

6) Was die Überosmiumsäure betrifft, so bin ich von ihrer Anwendung bei Arthropoden fast ganz zurückgekommen. Wenn man im Stande ist, die Thiere zu öffnen, so leistet, wie schon oben erwähnt, die Pikrinschwefelsäure Alles, was man nur verlangen kann; und da sie auch durch Chitin eben so rasch durchdringt wie die Überosmiumsäure, so ist letztere sowohl in wässriger Lösung als in Dampfform meines Erachtens fast immer zu entbehren. In der That brauche ich sie nur dann, wenn es mir darauf ankommt, die Anhänge des Hautskelettes, wie Haare, Borsten u. s. w. zu färben, und verwende sie nur selten, um histologische Details zu ermitteln¹. Das Gesagte gilt indessen keineswegs für diejenigen Thierstämme, deren Körper für wässrige Flüssigkeiten leicht durchdringlich ist; vielmehr ist hier, wie bekannt, das Osmium nur selten zu entbehren. Ich habe indessen auf diesem Gebiete dem schon durch so viele Forscher Ermittelten nichts hinzuzufügen².

7) Einen Übelstand hat allerdings die Anwendung der Überosmiumsäure im Gefolge. Es passirt nur allzu oft, dass trotz der größten Sorgfalt eine nachträgliche Überfärbung der mit ihr behandelten Objecte eintritt, so dass manche Präparate geradezu unbrauchbar werden. Nun ist zwar schon von anderer Seite darauf hingewiesen worden, dass die Einwirkung des genannten Reagens durch Einlegen der Objecte in Carmin oder Pikrocarmin unterbrochen wird, indessen ist meines Wissens bisher noch keine Methode angegeben worden, die es ermöglichte, den unerwünschten Niederschlag von Osmium wieder zu beseitigen, ohne doch die Structur der Gewebe erheblich zu schädigen. Dies macht aber durchaus keine Schwierigkeiten, so fern man nur die zu dunkel gewordenen Stücke bereits in Alkohol (von 70 oder 90 %) gebracht hat. Man schüttet einfach Krystalle von chlorsaurem Kalium hinzu, bis der Boden des Glases damit bedeckt ist, lässt mittels

¹ Eins der besten Objecte für Prüfung von Methoden bietet sich ohne Zweifel in der *Phronima sedentaria* dar. Hier ist jede Zelle, jeder Kern so überaus scharf definirt, dass man schon am lebenden Thiere fast Alles sehen und so die Güte der Conservirung beurtheilen kann. Die Überosmiumsäure hat mir aber auch bei Injection in die Leibeshöhle, wo sie also direct mit allen Organen in Berührung kam, nicht so viel gezeigt wie die Pikrinschwefelsäure. Aus diesem und anderen Gründen kann ich namentlich für größere Insecten das stundenlange Einlegen in Osmiumlösungen nicht für angezeigt halten und sehe die Resultate einer solchen Methode wohl nicht mit Unrecht stets misstrauisch an.

² Nach EMERY erhält sich bei Anwendung von Osmium die Farbe der gelben und rothen öligen Pigmente im Bindegewebe der Fische vortrefflich, während sie bei den übrigen Methoden bald verschwindet.

einer Pipette einige Tropfen concentrirter Salzsäure darauf gelangen und mischt, wenn das an seiner grünlichen Farbe kenntliche Chlor sich zu entwickeln begonnen hat. durch sanftes Schütteln die Flüssigkeiten mit einander. Die Anwendung von Wärme durch Einsetzen des Gefäßes in ein Wasserbad beschleunigt den Bleichprozess ungemein, indessen auch bei gewöhnlicher Temperatur habe ich große Pelagien, Carinarien, Rhizostomen u. s. w. in einem halben Tage wieder retten können und an ihnen keinerlei makroskopische Veränderungen bemerkt, so dass sie nach Versetzung in säurefreien Alkohol die mit ihnen vorgenommene Operation nicht verriethen. Kleine Objecte werden meist rascher entfärbt und leiden, da sie stets in Alkohol¹ bleiben, unter dieser Procedur auch nicht viel. Dr. Eisig hat die Güte gehabt, mit einigen Exemplaren der Serpulide *Salmacina* eine Probe anzustellen und erklärt sich von derselben befriedigt. Ich habe namentlich Sapphirinen als Testobjecte verwandt und dabei gefunden, dass zwar im Allgemeinen der Zustand der Gewebe ein guter geblieben war, aber doch der Glanz, welcher die Thiere im Leben auszeichnet und sich nur durch Conservirung mit Osmium erhalten lässt, sich gänzlich verloren hatte. Da nun dieser, wie bekannt, auf Interferenz beruht und nicht im Chitin, sondern in der Epidermis seinen Sitz hat, so müssen die Zellen der letzteren doch in etwas verändert worden sein. Indessen thut dies der sonstigen Brauchbarkeit der Objecte keinen Eintrag, besonders weil die von Osmium befreiten Thiere sich gut färben lassen. An den Sapphirinen habe ich übrigens in Bezug auf die Wirkung des Osmiums noch Folgendes constatirt. Der von dem genannten Reagens fixirte Glanz schwindet bereits durch Zusatz von 1 % Salpetersäure oder Salzsäure zum Alkohol, dagegen bleibt natürlich die in den Geweben niedergeschlagene Osmiumverbindung und mit ihr auch die Härte des ganzen Thieres bestehen. Da sich aber die letztere verliert, sobald durch Bleichen das Osmium entfernt worden, so beruht die Härtung, welche Gewebe durch Überosmiumsäure erfahren, in der That auf einer Einlagerung von anorganischer Materie.

Statt der Salzsäure kann man in der angegebenen Weise auch Salpetersäure benutzen und hat es dann mit dem frei werdenden Sauerstoffe zu thun. Die zuerst erwähnte Bleichmethode, welche nur

¹ Die geringe Menge Säure wirkt, wie es scheint, auf die in Alkohol befindlichen, also einer Quellung nicht so leicht fähigen Gewebe direct nur wenig ein. Die Ätherarten, welche sich durch das Chlor im status nascendi bilden, sind natürlich eben so unschädlich wie das chlorsaure Kalium selbst.

eine leichte Modification der schon früher von mir für Insecten¹ angegebenen darstellt, habe ich auch zur Entfernung natürlichen Pigmentes zu benutzen versucht, als es mir darauf ankam, einige der von GRENACHER in seinem großen Werke über die Augen der Arthropoden beschriebenen Verhältnisse an eigenen Präparaten zu sehen. Bei Mysis z. B. gelang es mir, die in Spiritus befindlichen Augen in toto hinreichend zu entfärben; besser noch ließ sich selbstredend mit den einzelnen Schnitten operiren; auf jeden Fall aber vermied ich, da auch die Tinctionsmittel alkoholischer Natur waren, die Quellungen, welche beim Gebrauche wässriger Flüssigkeiten oft so störend wirken (vergl. hierüber unten Nr. 11).

S) Was ich mit Bezug auf die Arthropoden von der Überosmiumsäure sagte, hat auch für die Chromsäure und erst recht für die chromsauren Salze Gültigkeit. Namentlich in letzteren ist, wenn man die Thiere nicht öffnet, eine leichte Maceration schon dort unvermeidlich, wo die Pikrinschwefelsäure noch rasch eindringt und gut conservirt. Im Allgemeinen gelangt in der Zool. Station wenigstens für die Wirbellosen die reine Chromsäure auch nicht viel zur Verwendung, wird aber im Verein mit dem Kleinenberg'schen Säuregemisch häufig benutzt, um den Geweben durch die sich in ihnen ablagernde Chromverbindung mehr Festigkeit zu geben (mit anderen Worten: sie mehr zu härten), als es das letztere allein vermag.

9) Einer besonderen Conservirungsflüssigkeit bedient sich Dr. LANG² seit Jahresfrist mit günstigem Erfolge. Veranlasst durch eine ältere Notiz von BLANCHARD operirt er mit Quecksilberchlorid, dem er auch Essigsäure oder Pikrinschwefelsäure zusetzt. Die ursprüngliche Vorschrift lautet: 100 Gewichtstheile destillirtes Wasser, 6—10 Chlor-natrium, 5—8 Essigsäure, 3—12 Quecksilberchlorid, eventuell noch $\frac{1}{2}$ Alann. Die Planarien, für welche diese Mischung ausgedacht ist, werden auf den Rücken gelegt und möglichst vom Seewasser befreit, dann mit der Sublimatlösung übergossen. Sie sterben dann in ausgestrecktem Zustande. Nach einer halben Stunde kommen sie in Alkohol erst von 70, dann von 90 %, endlich von 100 % und sind in 2 Tagen gehärtet. — In einer späteren Notiz³ giebt LANG als ähnliche Flüssigkeiten noch an eine concentrirte Lösung von Sublimat in Pikrinschwefelsäure mit 5 % Essigsäure oder einfach eine concentrirte wässrige Lösung des

¹ Vergl. Archiv für Anatomie und Physiologie von DU BOIS-REYMOND und REICHERT. 1874. p. 321.

² Zoologischer Anzeiger von VICT. CARUS. 1878. I. p. 14 u. 15.

³ Ebenda. 1879. II. p. 46.

Sublimates. Neuerdings verwendet er in schwierigen Fällen die genannten Flüssigkeiten siedend heiß und erzielt dadurch eine noch raschere Tödtung. Nach den Versuchen LANG'S und anderer Forscher »weisen sich alle Conservationsmethoden mit Sublimat z. Th. sehr gut, z. Th. brauchbar für Hydroiden, Korallen, kleine Ctenophoren, einige Gephyreen und Balanoglossus, Echinodermen . . . für Sagitta, viele Anneliden . . . ferner für Rhabdoceolen. Dendrocoelen lassen sich nur nach Conservation mit Sublimatlösung auf ihre Histologie genau untersuchen«. Dem Gesagten lässt sich noch hinzufügen, dass sich auch Cestoden und Trematoden, so wie die Larven der Turbellarien nach LANG'S neuesten Ermittlungen vorzüglich damit behandeln lassen. Indessen dürfen im Allgemeinen die mit Sublimat getödteten Planarien nicht lange in Alkohol bleiben, da sie brüchig werden; es empfiehlt sich daher, sie spätestens nach einigen Tagen zu färben und in Paraffin einzuschließen, in welchem sie dann, so zum Schneiden vorbereitet, längere Zeit liegen bleiben können. — Für Arthropoden habe ich bisher mit der LANG'Schen Methode keine günstigen Resultate zu erzielen vermocht.

10) Die von Prof. MERKEL angegebene¹ und nach ihm benannte Flüssigkeit, nämlich eine Lösung von je 1 Gewichtstheil Platinchlorid und Chromsäure in 800 Theilen Wasser, hat Dr. EISIG mit vielem Erfolge dazu verwandt, um die zarten Seitenorgane der Capitelliden schnittfähig zu machen, und empfiehlt sie zugleich auch für andere Organsysteme der Anneliden. Wie der Erfinder dies schon hervorhob, gewährt sie großen Spielraum in Bezug auf die Dauer der Einwirkung; für die Anneliden sind nach EISIG 4—6 Stunden ausreichend. Nach weiterer Behandlung mit Alkohol färben sich die Objecte vorzüglich, was namentlich wegen des Gehaltes der Mischung an Chromsäure hervorgehoben zu werden verdient.

Tinctionsmethoden.

11) Es ist in der Zoologischen Station allmählich zur Gewohnheit geworden, die mikroskopischen Präparate, so weit es irgend angeht, in Harzen aufzuheben und nur in Ausnahmefällen Glycerin oder andere wässrige Einschlüsse anzuwenden. Dies Verfahren bedingt naturgemäß den Durchgang der zu solchen Präparaten dienenden Gewebe durch Alkohol von verschiedenen Stärkegraden und legt so den Gedanken nahe, auch die Tinction auf alkoholischem Wege auszuführen, damit die Übertragung der in Alkohol aufbewahrten Thiere in wässrige Farb-

¹ MERKEL, Über die Macula lutea des Menschen u. s. w. Leipzig 1870. p. 19.

stofflösungen und die verschiedenen damit verbundenen Nachtheile in Wegfall kommen. Zu letzteren sind vornehmlich zu rechnen die Zerreibungen, welche namentlich bei dem rapiden Übergange aus der einen Flüssigkeit in die andere durch die heftigen Diffusionsströme erfolgen müssen und die bei brüchigem Gewebe zuweilen ganze Zellgruppen betreffen¹, ferner die eben so unvermeidlichen Quellungen², welche bei der Zurückführung in den Alkohol unmöglich immer in der gleichen Weise ausgeglichen werden, endlich die Macerationserscheinungen, die namentlich bei längerem Verweilen in Beale'schem Carmin eintreten (vergl. hierüber Nr. 15). Gewöhnlich also vertauscht ein in Alkohol befindliches Gewebstück denselben nur mit einer alkoholischen Farblösung oder einem ätherischen Öle bezw. Harze und wandert nicht wieder in Wasser zurück. Dies schließt natürlich nicht aus, dass nicht auch auf wässerigem Wege sich gute Färbungen erzielen ließen; im Gegentheile, es giebt Fälle, wo bei niederen Seethieren nur die letztere Methode zu befriedigenden Resultaten führt. Für die Turbellarien z. B. steht nach den eingehenden Versuchen von A. LANG fest, dass nur Pikrocarmin (vergl. unten Nr. 16) mit Erfolg zu verwenden ist, und so gewinnt es den Anschein, als sei es für die organische Materie gewisser Thiergruppen geradezu unerlässlich, wieder zu quellen und sich mit Wasser reichlich zu durchtränken, um sich in einer für das mikroskopische Unterscheiden brauchbaren Weise der Farbstoffe bemächtigen zu können. Eine solche Wasseraufnahme mag darum auch wohl namentlich für die mit Chromverbindungen behandelten Gewebe der höheren Thiere nicht so große Nachtheile im Gefolge haben, dass man nicht ruhig erst »auswässern«, dann mit Alkohol »entwässern« und endlich wässerig färben dürfte³. Auf der andern Seite ist aber sicher, dass im Allgemeinen eine alkoholische Farbstofflösung die Gewebe besser und rascher durchdringt, auch ohne Schaden für dieselben länger in ihnen verweilen mag, als es von den wässerigen Lösungen gilt. Vor Allem setzt das Chitin ihnen ein viel geringeres Hindernis entgegen und

¹ Nirgends ist mir dies auffälliger entgegengetreten, als bei gewissen großen Algen, wie Valonia, Acetabularia, Dasycladus, bei denen in Pikrocarmin der Primordialschlauch, welcher in Alkohol der Zellwandung fest angelegen hatte, sich in großen Lappen losriss und aus den angeschnittenen Zellen herausschwamm.

² Ähnlich spricht sich auch GRENACHER in seinem Artikel über neue carminhaltige Tinctionsmittel (Archiv f. mikroskop. Anatomie. 1879. Bd. XVI. p. 470) aus.

³ Bei den mit Pikrinschwefelsäure conservirten Objecten ist die Entfernung der Säure mittels Stiß- oder Meerwasser durchaus schädlich und muss darum nach der Vorschrift von KLEINENBERG unter allen Umständen mit Alkohol geschehen.

ermöglicht gute Färbungen in fast allen Fällen. Aus diesen Gründen ist es in der Station allgemein Regel, sich der alkoholischen Lösungen an erster Stelle zu bedienen und nur ausnahmsweise zu den wässrigen zu greifen.

12) Von den alkoholischen Farbstofflösungen ist in der Zoologischen Station seit langer Zeit das Kleinenberg'sche Hämatoxylin in stetem Gebrauch. Seine Anwendung sichert ganz präzise Kernfärbung und erheischt nur wenig Mühe. In erster Linie ist darauf zu sehen, dass die Objecte vor dem Färben völlig säurefrei gemacht werden; in dieser Hinsicht kann man des Guten nicht zu viel thun, den Alkohol nicht zu oft wechseln. Die nicht genügende Entsäuerung macht sich zwar im Allgemeinen nicht sofort geltend, bewirkt aber an den in Harzen aufbewahrten Präparaten nach kürzerer oder längerer Zeit eine Verblässung der Farbe, die bis zur gänzlichen Entfärbung fortschreiten kann und, da man sich dieses Umstandes nicht überall bewusst geworden, zu der Meinung Veranlassung gegeben hat, das Hämatoxylin liefere unhaltbare Präparate. Ich kann nach meiner und anderer Herren Erfahrung versichern, dass dem nicht so ist, und möchte sogar eher annehmen, dass allmählich eine Nachdunkelung stattfindet. Einem anderen Vorwurf, den ich öfter gehört habe, kann ich allerdings nicht widersprechen: die Hämatoxylinlösung selbst verdirbt leicht, wird missfarbig und bildet Niederschläge. Eine frisch bereitete¹, gute Lösung muss violett mit einem entschiedenen Stich ins Blaue aussehen und darf nicht etwa röthlich sein; wenn sie es nach einigem Stehen doch wird, so liegt das meistentheils daran, dass sie mittlerweile schwach sauer geworden ist. Ich helfe ihr dann wieder auf, indem ich den Stöpsel von einer mit Ätzzammoniak gefüllten Flasche kurze Zeit auf die Öffnung des Gefäßes mit der Farbstofflösung setze, so dass eine äußerst geringe Quantität Ammoniakdampf in letzteres

¹ Die ursprüngliche Vorschrift lautete dahin, dass man in einer concentrirten Lösung von Chlorcalcium in 70%igem Alkohol Alaun bis zur Sättigung auflösen und ferner eine gesättigte Lösung von Alaun in Alkohol von demselben Stärkegrade bereiten solle. Alsdann seien die beiden Flüssigkeiten in Verhältnisse von 1:8 zu mischen und mit Hämatoxylin, das man zuvor in Alkohol gelöst, zu versetzen. Neuerdings hat KLEINENBERG (*Sullo sviluppo del Lumbricus trapezoides*. Napoli 1878. p. 6) die Anfertigung in der Weise vereinfacht, dass man nur noch die erste der genannten Lösungen mit 6—8 Volumina 70%igen Alkohols zu verdünnen und beim Gebrauche mit beliebig vielen Tropfen einer concentrirten Lösung von Hämatoxylin in absolutem Alkohol zu mischen hat. Nach der Färbung lässt KLEINENBERG die Objecte mit 90%igem Alkohol ausziehen. Beim Zusammenbringen von Alaun und Chlorcalcium bildet sich übrigens ein Niederschlag von Gips; man würde also wahrscheinlich von vorn herein statt des Alauns bequemer Chloraluminium verwenden.

übertritt. Dies wird nach gutem Umschütteln schon zur Wiederherstellung der richtigen Farbe ausreichen, während ein Mehr sofort Niederschläge erzeugt und die Flüssigkeit ganz unbrauchbar macht.

Die Färbung selbst nimmt man, so fern es sich um kleinere Objecte handelt, am besten mit einer nur wenig Hämatoxylin enthaltenden Lösung vor, die allerdings langsam, aber distinct färbt. Will man eine zu stark erscheinende Tinctionsflüssigkeit noch nachträglich verdünnen, so thut man es zweckmäßiger Weise nicht mit Alkohol, weil dann leicht Niederschläge eintreten, die sich auf die Gewebe setzen und sie verunreinigen würden, sondern mittels der von KLEINENBERG vorgeschriebenen Alaun-Chlorcalciumlösung¹. Operirt man hingegen mit concentrirter Lösung, so tritt leicht Überfärbung ein, und diese muss man alsdann durch Auslaugen in saurem Alkohol entfernen. Man nimmt hierzu nach KLEINENBERG's Empfehlung Oxalsäure, kann aber auch Salzsäure (etwa $\frac{1}{2}$ 0/0) verwenden und darf die Gewebe ruhig so lange in ihr belassen, bis sie einen Stich ins Röthliche zeigen. Werden sie dann mit reinem Alkohol entsäuert, so geht die Farbe doch wieder in haltbares Blauviolett über. GRENACHER² erwähnt, dass A. THIERFELDER anrathet, die Präparate noch mit ganz schwach ammoniakalischem Wasser auszuspülen, und ist überhaupt der Meinung, dass man bei Hämatoxylin immer überfärben und dann mit Säure ausziehen müsse. Offenbar bezieht sich aber diese Angabe nur auf wässrige Lösungen.

Noch verdient Erwähnung, dass zum Durchfärben größerer Gewebstücke oder unaufgeschnittener Thiere mitunter tagelanges Verweilen derselben in stärkster Lösung erforderlich ist. Nachtheile irgend welcher Art machen sich dabei aber nicht bemerklich. Die Färbung wird intensiv genug, um selbst nach Conservirung mit Chrom- oder Osmiumverbindungen auch für die feinsten Schnitte noch auszureichen.

13) Ein in fast jeder Beziehung der Kleinenberg'schen Hämatoxylinlösung gleichwerthiges Färbemittel ist die Cochenilletinctur. Ich bin zu ihrer Verwendung bei den Versuchen gekommen, welche ich zur Gewinnung einer alkoholischen Carminlösung anstellte und halte sie darum auch hauptsächlich desswegen für nützlich, weil sie eine dem Carmin nahekommende Färbung auch da ermöglicht, wo die Undurchlässigkeit der Wandungen oder andere Eigenthümlichkeiten der Objecte den Gebrauch wässriger Carminalösungen verbietet. Speciell von Werth

¹ Das Chlorcalcium ist nach KLEINENBERG überhaupt nur erforderlich, um zwischen dem Alkohol in den Geweben und der außerhalb derselben befindlichen Lösung einen kräftigen Diffusionsstrom zu erzeugen.

² Arch. f. mikr. Anat. 1879. Bd. XVI. p. 467.

ist sie daher bei Arthropoden, deren Chitin bekanntlich Farbstoffe meist nur schwer durchlässt, eignet sich aber auch in alle den Fällen, in denen man einen Gegenstand alkoholisch zu tingiren Veranlassung hat. Ihre Bereitung sowohl als auch ihre Anwendung sind höchst einfach. Gewöhnliche gröblich zerkleinerte Cochenille wird mit 70 % igem Alkohol übergossen und mehrere Tage damit in Berührung gelassen. Auf ein Gramm des Farbstoffes nimmt man 8—10 cem Alkohol und erhält so nach der Filtration eine klare tief rothe Flüssigkeit, welche ohne Weiteres verwendet werden kann. Man hat nur nöthig, die zu färbenden Objecte, falls sie nicht schon in 70 % igem Alkohol sich befanden, auf kurze Zeit in denselben zu legen, dann in die Tinctur zu bringen und in dieser so lange zu belassen, bis sie von ihr ganz und gar durchtränkt sind. Bei kleinen Gegenständen, wie feinen Schnitten, kleinen Würmern, Protozoen, niederen Arthropoden u. s. w. ist das meist schon in einer Viertelstunde, oft bereits in wenigen Minuten geschehen, während größere Thiere, namentlich solche, die späterhin in Schnitte zerlegt werden sollen und darum einer recht intensiven Färbung bedürfen, einige Stunden oder selbst Tage mit der Tinctur in Berührung bleiben müssen. In letzterem Falle ist vor Allem dafür zu sorgen, dass eine reichliche Menge derselben vorhanden sei, weil sonst leicht nicht so viel Farbstoff in Lösung befindlich ist, wie das Gewebe aufnehmen möchte. Feine Schnitte wie überhaupt zarte Präparate behandelt man übrigens am besten nicht mit der concentrirten, sondern mit einer stark verdünnten Tinctur und kann zu diesem Zwecke mit Nutzen auch die bereits einmal gebrauchte Flüssigkeit verwenden. Die Färbung geht alsdann langsamer vor sich, wird aber schöner, wie das ja auch bei anderen Tinctionsmitteln der Fall ist. Unbedingt nöthig ist aber immer das Entfernen des überschüssigen Farbstoffes aus dem Gewebe und zwar geschieht dies einfach durch 70 % igen Alkohol, der so lange gewechselt werden muss, als er noch gefärbt erscheint¹. Auf diese Weise erreicht man, dass nur derjenige Theil des Cochenillepigmentes, der von den Geweben chemisch gebunden wird, in ihnen zurückbleibt, und vermeidet also jegliche diffuse Färbung. In erster Reihe sind die Kerne stark gefärbt, indessen hält auch das Protoplasma etwas Pigment zurück und ist so in dickeren Schichten mitunter recht dunkel tingirt. Eine Überfärbung, welche die

¹ Auch diese Operation erfordert mitunter bei großen Stücken lange Zeit und viel Flüssigkeit, kann aber mit warmem Alkohol wesentlich rascher, und wie mir scheinen will, ohne Schaden für das Object ausgeführt werden. Der Waschkohol dient mir zur Entsäuerung der mit Pikrinschwefelsäure conservirten Thiere, geht also nicht verloren.

Präparate unbrauchbar machen würde, kommt nur äußerst selten vor, denn im Allgemeinen ist die Verwandtschaft der in Alkohol befindlichen Gewebe zu dem gleichfalls in Alkohol dargebotenen Farbstoffe nicht so groß, dass die Aufspeicherung des letzteren in den Kernen oder auch den Zellenleibern den Präparaten die gewünschte Durchsichtigkeit nehmen könnte.

Was die Farbe selbst betrifft, welche die mit Cochenilletinctur behandelten Objecte nach dem Auswaschen mit 70 %igem Alkohol schließlich erlangen, so hängt sie theils von der Reaction der Gewebe, theils von dem Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Salze ab. In dieser Beziehung habe ich eine Reihe von Versuchen angestellt, die mir folgende Resultate ergeben haben. Zunächst ist zu bemerken, dass bei der großen Mannigfaltigkeit von Stoffen, die in dem Rohstoffe Cochenille als einem getrockneten Insecte vorkommen, Auszüge desselben mit Alkohol von verschiedenen Stärkegraden natürlich bedeutende Verschiedenheiten zeigen werden. Die mit absolutem oder mit 90 %igem Alkohol gewonnenen Tincturen sind ganz hell und für die mikroskopische Technik werthlos, da sie diffus färben; sie können also, obgleich sie ceteris paribus leichter durch Membranen durchdringen, als schwächerer Alkohol, keine Verwendung finden. Je mehr Wasser von vorn herein in der Tinctur vorhanden ist, desto mehr brauchbaren Farbstoff enthält sie, und so wäre die mit 60- oder 50 %igem Alkohol dargestellte der von mir empfohlenen vorzuziehen, wenn nicht eben auf das leichte Eindringen in die Objecte, als auf das Haupterfordernis Gewicht gelegt werden müsste. Jede der genannten Tincturen übrigens giebt bei ihrer Vermischung mit stärkerem oder schwächerem Alkohol (und so auch mit Wasser) Trübungen und Niederschläge, enthält demnach Materien, die nur in Alkohol von dieser bestimmten Concentration löslich sind. Hieraus geht hervor, dass zur völligen Ausziehung des nicht fixirten Farbstoffes ein gleich starker Alkohol durchaus nothwendig wird. — Weiter habe ich gefunden, dass Säuren die Tinctur heller, mehr gelbroth machen. Auf die Färbung der Gewebe hat diese Reaction nur in so fern Einfluss, als man alles in den ersteren niedergeschlagene Pigment durch sauren 70 %igen Alkohol ($\frac{1}{10}$ % Salzsäure oder 1 % Essigsäure) daraus entfernen und so eine Überfärbung bequem corrigiren kann. Auf der anderen Seite verwandelt der Zusatz von Ammoniak oder einem andern kaustischen Alkali die Farbe der Tinctur in ein tiefes Purpur¹. Wesent-

¹ Diese Eigenschaft macht die Cochenilletinctur zu einem geschätzten und viel gebrauchten Indicator in der Acidimetrie, zumal freie Kohlensäure keine Änderung in der Farbe hervorbringt.

lieher ist noch der Umstand, dass die in Alkohol löslichen Salze der Metalle und alkalischen Erden blaugraue, grüngraue oder blauschwarze Niederschläge geben. Behandelt man daher z. B. ein bereits gefärbtes und ausgewaschenes Gewebestück nachträglich mit einer alkoholischen Lösung eines Eisen- oder Kalksalzes, so wird man stets eine mehr oder minder tiefblaue Färbung des Objectes erzielen. Da nun in den meisten Fällen die im lebenden Organismus vorhandenen Salze durch die Conservirung in Säuren und Alkohol nicht völlig entfernt, zuweilen wohl noch durch neue vermehrt werden, so wird gewöhnlich das Object, obwohl es in eine rothe Farbflüssigkeit gebracht worden, von selbst mehr oder weniger blau aus ihr hervorgehen, so dass es häufig nicht von einem mit Hämatoxylin behandelten zu unterscheiden ist¹. Natürlich wird bei Gegenwart von Säuren ein solcher Niederschlag in den Kernen resp. Zellen nicht entstehen können, und so werden sowohl saure als auch salzfreie Gewebe allemal roth gefärbt sein. Im Einzelfalle lässt sich demnach nicht vorhersagen, in welcher Farbe die Objecte nach der Tingirung erscheinen müssen, doch werden nach meinen Erfahrungen im Allgemeinen die mit dickem Chitinpanzer versehenen Crustaceen roth, die übrigen Thiere meist blau gefärbt, so dass also z. B. die auf Amphipoden lebenden Vorticellinen sich auf den ersten Blick als fremde Organismen erkennen lassen. Auch die Gewebe eines und desselben Thieres bieten oft verschiedene Färbungen dar. So hat mir beispielsweise KLEINENBERG mitgetheilt, dass er bei Embryonen von *Lumbricus* die Gefäße roth, ihren Inhalt dagegen intensiv blau tingirt erhalten habe. Wenn Drüsen ins Spiel kommen, so werden sie oder ihre Secrete

¹ Dass die Blaufärbung in der That nicht auf der Wirkung des organischen, sondern des anorganischen Bestandtheiles der Gewebe beruht, geht auch daraus hervor, dass pulverisirte Cochenille beim Ausziehen mit wässriger oder alkoholischer Lösung von Chlorecalcium ihre Farbe umändert, während die überstehende Flüssigkeit nur ganz schwach rosenroth aussieht. Umgekehrt wird die intensive Färbung des Kernes im Vergleich mit der des Plasmas wohl ausschließlich in der Beschaffenheit der organischen Materie ihren Grund haben. — In der Färberei scheint man übrigens die erwähnte Eigenschaft gewisser Salze auch zu kennen und in Anwendung zu bringen, wenigstens finde ich in dem Dictionnaire de Chimie pure et appliquée par AD. WURTZ auf p. 769 die Bemerkung von P. SCHÜTZENBERGER: »Les mordants de fer prennent, suivant leur force, dans un bain de cochenille, des teintes grises, violet-gris ou noir grisâtre«. Was das gewöhnliche Carmin betrifft, so löst es sich zwar bekanntlich in Ammoniak mit prächtig rother Farbe, wird aber beim Übergießen mit Barytwasser violett und giebt auch nach längerem Kochen damit nur eine hellgelbe Lösung; in Ammoniak gelöst wird es von Barytwasser völlig ausgefällt.

häufig graugrün, und fallen auf diese Weise leicht ins Auge¹. Unter Umständen kann indessen der Niederschlag, welchen die Salze von Calcium, Magnesium u. s. w. geben, der Untersuchung auch Hindernisse bereiten, wie ich schon oben unter Nr. 3 aus einander gesetzt habe.

Was die mit Cochenilletinctur zu färbenden Objecte betrifft, so möchte ich hervorheben², dass sie am besten vorher mit Chrom- resp. Pikrin-Verbindungen conservirt oder auch direct in Alkohol getödtet werden. Je sorgfältiger die Conservirung geschehen und namentlich die etwa angewendete Säure durch Auswaschen mit Alkohol entfernt worden ist, desto intensiver und präciser wird die Färbung ausfallen und sich vorwiegend als Kernfärbung³ zu erkennen geben. Indessen sind leichte Spuren von Säure hier weniger schädlich, als dies bei Hämatoxylin der Fall ist, da ein allmähliches Ausbleichen der Farbe nach meinen Erfahrungen nicht stattfindet⁴. Die mit Osmiumsäure conservirten Objecte tingiren sich äußerst wenig, und werden also nur dann für die Cochenille geeignet sein, wenn man auf die unter Nr. 7 besprochene Art das Osmium wieder aus den Geweben entfernt hat.

Aus dem Vorstehenden ergibt sich, dass das neue Färbemittel im Allgemeinen der Kleinenberg'schen Hämatoxylinlösung nahe kommt. Es ist leichter zu gewinnen und bequemer anzuwenden, als diese, lässt aber nie eine so intensive Färbung zu. In weitaus den meisten Fällen wird dies von keiner Bedeutung sein, indessen wenn es sich um die Tinction großer Gewebspartien oder ganzer Thiere behufs Anfertigung von Schnittserien handelt, thut man oft gut, das Hämatoxylin zu nehmen. Immerhin habe ich Rückenmark von Wirbelthieren in Stücken von über einem Centimeter Länge noch hinreichend färben können und greife

¹ Das Secret der Leber, welches die meisten Amphi- und Isopoden beim Conserviren in Alkohol oder Säuren von sich geben und das sich um den Mund herum in geronnener Form anhäuft, färbt sich constant violett oder blau.

² Vergl. hierüber auch meine erste Mittheilung im Zool. Anzeiger von V. CARUS, 1878. I. p. 345—346.

³ Will man auch das Plasma stark tingirt haben, so braucht man nur unvollständig auszuwaschen und den zurückgebliebenen diffus verbreiteten Farbstoff durch Einlegen des Präparates in stärkeren Alkohol zu fixiren.

⁴ Fertige, d. h. in Harzen aufbewahrte Präparate haben sich seit über einem Jahre nicht im Geringsten verändert. In Nelkenöl, das dem Hämatoxylin nicht günstig ist, habe ich gleichfalls Monate lang verschiedene mit Cochenille gefärbte Objecte theils unter dem Deckglase, theils frei ohne Schaden liegen lassen können. Nur starke Erwärmung in Paraffin verträgt auch der Cochenillefarbstoff nicht gut, sondern wird zum Theil zerstört.

daher nur da, wo mich die Cochenilletinctur im Stiche lässt, zu einer anderen Farbflüssigkeit¹.

14) In dem Bestreben, noch andere Tinctionsmittel in alkoholischer Lösung zugänglich zu machen, habe ich Versuche mit einer Reihe von Farbwaren des Handels angestellt, indessen immer nur Resultate erzielt, welche den mit der Cochenille erhaltenen nicht gleich kamen. Sandelholz, Fernambukholz, Cureumawurzel, Krappwurzel, Alizarin, Alkannawurzel, Walnusschalen gehören hierher. Auch GRENACHER² hat das Bedürfnis gefühlt, mit Carmin auf alkoholischem Wege zu färben, und verwendet zu diesem Behufe eine durch Kochen von Carmin mit Alkohol und Salzsäure gewonnene Flüssigkeit. Nach den Proben, welche ich selbst mit ihr gemacht, scheint sie mir in vielen Fällen nicht unerheblich stärker als die Cochenilletinctur zu färben und dabei doch gleiche Präcision zu verrathen. Der einzige Uebelstand ist bei ihr nur der, dass sich bei der Anfertigung ein gewisses Tasten zur Ermittlung der richtigen Säuremenge nicht vermeiden lässt. Die Salzsäure selbst dient wohl nur zur Freimachung der im Carmin enthaltenen und in Alkohol löslichen Carminsäure. Das aus letzterer durch verdünnte Schwefelsäure zu gewinnende Carminroth hat, wie ich aus FREY³ entnehme, schon ROLLLET benutzt, aber in wässriger Lösung. Mit welchem Erfolge weiß ich nicht, da mir die betreffende Arbeit nicht zugänglich ist.

15) Was die wässerigen Tinctionsmittel angeht, so werden sie im Allgemeinen nur dann benutzt, wenn die alkoholischen im Stiche lassen, also z. B. wenn es sich um Maceration handelt u. s. w. Man geht dabei, wie schon oben erwähnt, von der Annahme aus, dass sich Quellungen und ähnliche Erscheinungen nur allzu leicht einstellen, so bald die in Alkohol aufbewahrt gewesenen Objecte längere Zeit in Wasser oder sogar schwachen Säuren oder auch in verdünntem Ammoniak verweilen müssen. Namentlich letzteres Mittel spielt bei dem bekannten Beale'schen Carmin eine zu bedeutende und für die feineren Struc-

¹ KLEINENBERG hat, wie schon oben erwähnt, zu seiner Hämatoxylinlösung nur deshalb Chlorecalcium gefügt, um zwischen ihr und dem in den Objecten befindlichen Alkohol starke Diffusionsströme zu erzeugen, welche eine intensivere Färbung veranlassen sollen. Bei der Cochenilletinctur habe ich Ähnliches versucht, indessen von dem für sie allein möglichen Salze, dem Chlorammonium, keinerlei Vortheil verspürt.

² GRENACHER, H., Einige Notizen zur Tinctionstechnik, besonders zur Kernfärbung. Archiv f. mikrosk. Anatomie. 1879. Bd. XVI. p. 463—471.

³ FREY, Das Mikroskop und die mikroskopische Technik. 6. Aufl. 1877. p. 93 und 96.

turverhältnisse zu verderbliche Rolle, als dass man nicht gegen die mit ihm erzielten Färbungen trotz ihres prachtvollen Tones misstrauisch sein müsste. Auf Kernspindeln, Kerngerüste u. s. w. wird man alsdann zu verzichten haben¹. Nur das Pikroearmin scheint (ob wegen seines Gehaltes an Pikrinsäure?) nicht so ohne Weiteres in diese Kategorie gestellt werden zu dürfen, zumal sich mit ihm zuweilen viel präzisere Bilder erhalten lassen, als mit irgend einem sonstigen Farbstoffe. Leider ist es im Handel nicht immer in gleichbleibender Güte zu bekommen und enthält auch oft zu viel Pikrinsäure. Es empfiehlt sich daher unter Umständen, eine gewöhnliche recht starke Carminlösung (etwa 2 g auf 25 cem Wasser), deren Ammoniak durch wochenlanges Stehen an der Luft verdunstet ist, mit concentrirter wässriger Pikrinsäurelösung so lange zu versetzen, als noch kein Niederschlag entsteht auf 1 Raumtheil Carminlösung etwa 4 Raumtheile der letztgenannten Flüssigkeit) und dieses Gemisch ohne Weiteres zum Färben zu benutzen. Allerdings wird bei Arthropoden durch das Chitin, so wie es nicht mehr ganz besonders zart und dünn ist, nur die Pikrinsäure resp. das pikrinsaure Ammoniak, nicht aber das Carmin durchgelassen.

16) Neuerdings hat A. LANG² ein Gemisch von gleichen Theilen einer 1%igen Pikrocarminlösung und einer 2%igen wässrigen Eosinlösung namentlich für die Planarien empfohlen. Die vorher in Alkohol gehärteten Objecte verbleiben in der Farbflüssigkeit $\frac{1}{2}$ —4 Tage und werden dann mit Alkohol von 70, 90 und 100% so lange gewaschen, bis die Pikrinsäure und das überschüssige Eosin fortgeschafft sind. Der Vortheil der Methode scheint darin zu beruhen, dass das leicht eindringende Eosin gewissermaßen als Vehikel für das Carmin dient und so eine bessere Ablagerung des letzteren ermöglicht. Es färben sich in dieser Weise nicht nur die Kerne der Ganglienzellen, sondern auch die Fortsätze derselben und die Nervenfasern sehr distinct, aber schwach. Für Arthropoden steht nach unseren gemeinschaftlich angestellten Versuchen kein besonderer Erfolg zu erwarten.

17) Von der Verwendung der Anilinfarbstoffe ist man in der

¹ In seiner Arbeit über das Nervensystem der Squilla beschreibt BELLONCI (Annali del Museo Civico di Storia naturale di Genova. 1875. XII. p. 523) eigenthümliche Halbmonde in den Ganglienzellen. Ich habe mich davon überzeugt, dass es Kunstproducte sind und dem Tinctionsmittel, nämlich dem Beale'schen Carmin ihren Ursprung verdanken, dagegen bei sorgfältiger Conservirung und Färbung nicht auftreten. Auch GRENACHER (Arch. f. mikrosk. Anat. 1879. XVI. p. 464) hält von der genannten Lösung nicht viel und macht übrigens mit vollem Rechte auf die Verschiedenheit der käuflichen Carminsorten aufmerksam.

² Zoologischer Anzeiger von VICT. CARUS. 1879. II. p. 45 und 46.

Zool. Station völlig zurückgekommen. Nicht als ob sie nicht haltbar genug wären — ich selbst besitze einen mit Fuchsin gefärbten und in Balsam aufbewahrten Schnitt durch einen entkalkten Knochen und finde, dass er in sieben Jahren noch nichts von der Intensität der Farbe verloren hat — sondern weil sie meist diffuse Bilder liefern. Dies gilt meiner Ansicht nach auch von dem so viel gerühmten Eosin. Im Allgemeinen kommt es bei den zoologischen Untersuchungen doch auf Kernfärbung an, und diese ist durch die ganze Reihe der oben besprochenen Mittel besser und sicherer zu erzielen, als mit den vielen neuerdings in Gebrauch gezogenen Anilinderivaten. Wie wenig beständig die Verwandtschaft derselben zu den Kernen ist, geht daraus hervor, dass auch intensiv gefärbte Präparate bei Behandlung mit Alkohol sich völlig des so begierig aufgenommenen Farbstoffes berauben lassen. (Nur das Bismarckbraun macht in dieser Beziehung eine Ausnahme und ermöglicht so eine freilich wenig intensive, aber doch haltbare Tinction.) So lange es sich also nicht um Sichtbarmachung von Differenzirungen in Membranen, von Stadien des Verknöcherungsprozesses u. s. w. handelt, kann von der großen Gruppe dieser Mittel völlig abgesehen werden.

Injectionsmethoden.

18) Mit Injectionen des Gefäßsystems von Fischen hat sich in der letzten Zeit Prof. CARLO EMERY beschäftigt und theilt mir in Bezug auf die von ihm angewendeten Methoden Folgendes mit. a) Bei Injectionen mit Leimearmin hält er sich wegen der Masse an die von RANVIER in dessen *Traité d'histologie technique* gegebene Vorschrift, neutralisirt aber, um den umständlichen Gebrauch von titrirter Essigsäure und Ammoniaklösung zu umgehen, auf einfachere Art. Zu dem im Wasserbade befindlichen Carminleime wird tropfenweise verdünnte Essigsäure zugesetzt, bis der Geruch nach Ammoniak undeutlich zu werden anfängt. Dann wird die Reaction der Dämpfe mit Lackmuspapier geprüft und, wenn dieses roth zu werden beginnt, mit dem Zusatze von Essigsäure aufgehört. Oft kehrt dann beim Umrühren der Masse die alkalische Reaction wieder und muss durch noch einen Tropfen Säure beseitigt werden. Diffusion durch die Gefäßwandungen ist bei einer ganz neutralen oder kaum sauren Masse nicht zu befürchten. b) Als kaltflüssige Masse empfiehlt EMERY eine 10%ige mit Ammoniak bereitete Carminlösung, welcher unter beständigem Rühren so lange Essigsäure zugesetzt wird, bis durch beginnende Fällung des Carmins die Farbe der Flüssigkeit in blutroth umschlägt. Zur Verwendung ge-

langt nur die über dem geringen Niederschlage stehende klare Lösung. Nach der Injection werden die Objecte sofort in starken Alkohol gebracht, damit das Carmin rasch gefällt werde. Die Füllung der Gefäße ist für gewöhnlich völlig ausreichend. c) Handelt es sich nicht um eine Injection der Capillaren, so erlangt man oft gute Resultate, wenn man die 10%ige Carminlösung allmählich so stark mit Essigsäure mischt, dass das Carmin zum Theile ausgefällt wird. Man muss alsdann die Flüssigkeit vor dem Gebrauche umschütteln und nur einige Minuten absetzen lassen, damit die gröberen Körner nicht mit in die Spritze gelangen. Bei Injection der Arterien bleibt gewöhnlich viel von dem feineren Sedimente in den Capillaren stecken und so dringt nur eine hellere Flüssigkeit in die Venen ein. Auf diese Weise lassen sich letztere leicht von den dunkelroth gefärbten Arterien unterscheiden.

Einschlussmethoden.

19) Die wässerigen Einschlussflüssigkeiten, wie Glycerin, Gummiglycerin, essigsäures Kalium u. s. w. bieten an diesem Orte zu keinerlei Bemerkung Veranlassung. Dagegen mögen in Betreff der Harze und Balsame, welche ohnehin in der Zool. Station vorwiegend zur Verwendung kommen, noch einige Punkte zur Besprechung gelangen.

Zuerst möchte ich hervorheben, dass es bei genügender Vorsicht nur selten nicht möglich ist, ein Präparat dergestalt in Harzen zu conserviren, dass man nicht mehr an ihm sähe als an einem in Glycerin oder ähnlichen Flüssigkeiten aufbewahrten, und dass also schon aus diesem einen Grunde die ersteren entschieden vor den letzteren den Vorzug verdienen. Die einzige Klippe, an der man unter Umständen leicht scheitern kann, liegt beim Übergang der Präparate aus dem Alkohol in das Nelkenöl oder die ihm gleichwerthigen anderen ätherischen Öle. Bis dahin findet in den Geweben weiter nichts als eine Wasserentziehung statt und diese erfolgt, wofern nur die Objecte vorher in der richtigen Weise conservirt sind, unter schwacher, gleichmäßiger oder, wenn dies nicht der Fall sein sollte, doch controllirbarer und in ihren Wirkungen bekannter Schrumpfung. Im Allgemeinen bringt man jene bekanntlich aus 70%igem in 90%igen und von diesem in den sogenannten absoluten Alkohol. Den letzten kann man indessen bei dünnen, leicht durchlässigen Objecten entbehren und wird dann nur das ätherische Öl, welches die Durchgangsstufe zum Harze bildet, leicht zu erwärmen haben, um die noch vorhandene Spur Wassers mit Sicher-

heit zu entfernen. Unter Umständen darf man in ähnlicher Weise schon nach dem 70 %igen Alkohol direct das ätherische Öl, namentlich wenn es ein hohes specifisches Gewicht besitzt (Nelken- oder Zimmtöl), anwenden. In alle den Fällen nun, in denen die Diffusionsströme, welche bei dem rapiden Übergange von dem leicht beweglichen Alkohol in die mehr oder weniger trägen Öle entstehen, auf ihrem Wege nicht auf Hindernisse stoßen, wird sich keinerlei Inconvenienz zeigen; so wie jedoch die Ausgleichung der Flüssigkeiten durch schwer durchlässige und dabei weiche, nachgiebige Membranen hindurch vor sich gehen muss, ist eine Schrumpfung die unausbleibliche Folge. Bei Thieren also mit großer Leibeshöhle und dünnen, aber zugleich wenig permeablen Körperwänden tritt der Alkohol eher aus als das ätherische Öl eindringen kann; das Resultat ist ein Zusammenklappen der Wandungen. Man hat hiergegen wohl die Anwendung des Kreosotes empfohlen; und in der That schrumpfen in diesem Objecte der bezeichneten Art im Allgemeinen nicht so viel, holen dafür aber beim Übertragen in die Harzlösung das Versäumte fast immer nach. Ich sehe darum in der Anwendung des Kreosotes nach dieser Richtung hin keinen Vortheil und begegne dem besprochenen Übelstande viel wirksamer dadurch, dass ich die betreffenden Objecte noch unter Alkohol mit einer ganz feinen Schere an einer indifferenten Körperstelle eben anschneide und so eine directe Communication der Leibeshöhle mit dem Medium herstelle. Dies Mittel hilft ohne Weiteres und lässt sich, so fern man sich nur einer recht gut gearbeiteten Schere oder einer weißelartig geschärften Nadel bedient, noch bei sehr kleinen Thieren (Auricularien und anderen Larven etc.) anwenden. Versagt aber auch dieses, so kann man, namentlich wenn die Anzahl der in das Harz zu übertragenden Exemplare eine große ist, leicht dadurch zum Ziele kommen, dass man die Verdrängung des Alkohols durch das Öl eine ganz allmähliche sein lässt. Beispielsweise habe ich bei sehr frühen Entwicklungsstadien von Echinodermen mir in der Weise geholfen, dass ich die noch in Alkohol befindlichen Larven mittels eines feinen als Capillare wirkenden Lymphröhrchens in eine recht enge, unten rund zugeschmolzene Röhre brachte, in der bereits ein Tropfen Nelkenöl war. Nach Verlauf eines halben Tages waren alsdann die Larven, welche zuerst noch über dem Öle schwammen, auf dem Grunde desselben angelangt und konnten mit dem nämlichen Lymphröhrchen leicht auf den Objectträger befördert werden.

20) In dem Nelkenöl lasse ich die mikroskopischen Präparate oft Monate lang und sichere mir so den großen Vortheil, die Objecte rasch und bequem umlegen oder sonst wie behandeln zu können. Dabei

ist die Verdunstung unter dem Deckglase her eine äußerst geringe und auch die Bräunung des Öles geschieht zu allmählich, um hinderlich zu werden. Noch langsamer verflüchtigt sich Nitrobenzin, das mit Bezug auf das Lichtbrechungsvermögen schon dem Zimmtöl nahe kommt; leider aber veranlasst es, wenn es beim Hinzufügen des Balsams nicht ganz sorgfältig abgesaugt wird, im Laufe der Zeit eine unangenehme Bräunung des letzteren und kann daher, obwohl es sich auch wegen seines sehr geringen Preises besonders empfehlen dürfte, mit dem Nelkenöl nicht rivalisiren. An Stelle des letzteren habe ich übrigens mit Nutzen das bedeutend billigere Zimmtöl angewendet, das noch dazu die angenehme Eigenschaft besitzt, viel stärker lichtbrechend zu sein, als Balsam oder Harz. Wenn man also ein Präparat, nachdem es in Alkohol gewesen, zunächst in dem sehr wenig brechenden Terpentinöl (oder Bergamottöl), dann in Zimmtöl (oder Nelkenöl) untersucht, so wird man unter Umständen Einzelheiten entdecken, welche beim directen Einlegen in Harze für das Auge verschwunden wären. Die mit Cochenilletinctur erzeugten Färbungen nehmen, wie schon erwähnt, selbst bei Monate langem Verweilen in den genannten Ölen an Intensität nicht ab; es ist also auch nach dieser Richtung hin keinerlei Bedenken zu erheben. Übrigens erweist sich das Nelkenöl auch als Flüssigkeit zum Präpariren mit Nadel und Pincette als so vortrefflich, dass ich, wenn es eben angeht, manche in toto conservirte und gefärbte kleinere Thiere erst in ihm secire (vergl. unten Nr. 22).

21) Von Harzen wird seit geraumer Zeit auf Empfehlung von KLEINENBERG meist nicht mehr Canadabalsam, sondern Colophonium angewendet. Die Lösung des letzteren in absolutem Alkohol eignet sich aber nicht, da sie in den fertigen Präparaten nachträglich unter Umständen große Krystallbündel entstehen lässt, vielmehr muss Terpentinöl als Solvens dienen. Hieraus ergibt sich leider der eine Nachtheil, dass die Einschlussmasse äußerst langsam hart wird. Es scheint aber, als wenn die Lösung in Chloroform, welche allerdings filtrirt werden muss, sich in jeder Beziehung gut bewähre, indessen sind die Erfahrungen hierüber noch nicht so ausgedehnt, um dieses Mittel unbedingt empfehlen zu können. Eine Lösung von Sandarak in absolutem Alkohol, welche ich nach dem Vorgange Anderer früher benutzte, hat sich mir in so fern nicht bewährt, als die Präparate im Laufe der Zeit Luftblasen erhielten und zuletzt ganz abblättern.

Präparationsmethoden.

22) Die Präparirung einzelner Organe mittels Schere, Pincette und Nadeln findet gewöhnlich beim frischen Thiere in wässerigen Flüssigkeiten, wie schwachem Alkohol, Lösungen von Chromsalzen u. s. w. statt. Dieses Verfahren bringt es mit sich, dass eine gewisse Maceration aller Gewebe Platz greift, so dass es hinterher vielfach nicht mehr möglich ist, über den histologischen Charakter der betreffenden Theile ins Klare zu kommen. Bei größeren Thieren, welche in toto nicht gut conservirt werden können, thut man daher gut, wie schon oben aus einander gesetzt wurde, sich der Pikrinschwefelsäure zu bedienen und direct in ihr ohne Rücksicht darauf, dass die schneidenden Instrumente darunter leiden, die gewünschten Theile so weit zu präpariren, wie es eben angeht. Man ist dann, wenn man die Flüssigkeit, sobald sie trübe wird, durch reine ersetzt, und später auch den Alkohol nicht spart, sicher, ein sowohl organologisch wie auch histologisch gutes Präparat zu gewinnen, das sich vorzüglich färben und zur mikroskopischen Untersuchung zubereiten lässt. Um eine mitunter angenehme stärkere Härtung der Gewebe zu erreichen, kann man der Pikrinschwefelsäure noch Chromsäure zusetzen. Die sohergestalt erlangten Präparate von Theilen größerer Thiere oder auch die kleineren in toto conservirten und gefärbten Thiere werden später in Nelkenöl gebracht und darin mit feinen Nadeln und Scheren weiter behandelt. In Folge ihrer Durchsichtigkeit gewähren sie weit eher Aufschluss über Einzelheiten, als wenn sie noch in Alkohol oder wässerigen Flüssigkeiten lägen und erleichtern daher die Arbeit bedeutend. Auch die Brüchigkeit, welche das Nelkenöl hervorruft, ist in der Mehrzahl der Fälle vortheilhaft und kann im Übrigen durch Zusatz von Kreosot beliebig verringert werden. Der Neigung zur Tropfenbildung, welche das Nelkenöl besitzt, wirkt man durch Hinzufügung von Bergamottöl entgegen und hat es so ganz in der Gewalt, ob man auf einem ebenen (nicht ausgehöhlten) Objectträger in einem kleinen und hohen oder einem großen, aber flachen Tropfen präpariren will. Lästig ist nur der Umstand, dass der Athem des Präparirenden sich auf dem Öle in Form feinsten Tröpfchen niederschlägt. Wenn man indessen die Vorsicht gebraucht, durch ein in den Mund genommenes Gummirohr auszuathmen, so wird man auch dieser Sorge enthoben sein. Im Ganzen kann ich die angegebene Methode nicht genug empfehlen, da sie bei aller Einfachheit so gute Resultate liefert.

Einbettungsmethoden.

23) Ganz allgemein verwendet wird zum Einbetten behufs der Anfertigung von Schnitten mit dem Messer oder dem Mikrotom das Paraffin entweder unvermischt oder mit Schweinefett versetzt. Statt des letzteren dient auch eine Art Paraffin, welche im Sommer bei hohen Hitzegraden wegen ihres Gehaltes an flüssigen Kohlenwasserstoffen weich zu werden beginnt, und ist dem Fette in so fern vorzuziehen, als sie nicht wie dieses dem Ranzigwerden unterworfen ist. Auch das zuerst von England her empfohlene Vasellin ist aus gleichem Grunde in Gebrauch gezogen worden. Die Einbettung geschieht, nachdem die Objecte je nach Umständen noch ein warmes Bad von Paraffin und Terpentinöl oder Paraffin und Kreosot passirt haben, auf die gewöhnliche Weise. Geschnitten wird auch mit dem Mikrotom trocken; dem Aufrollen der Schnitte wird durch ein kleines Schüftelehen, das man ohne jeglichen Druck dicht über die schneidende Stelle der Klinge hält, vorgebeugt. Im Allgemeinen liefert diese Methode, welche von allen mir bekannten offenbar die bequemste ist, ausgezeichnete Resultate. Nur bei sehr brüchigen Objecten ist das Einbetten in Wachs und Öl nach BRÜCKE oder in ähnliche Mischungen und das Schneiden unter Alkohol vorzuziehen, da es die Objekte geschmeidiger hält. Doch kann man bei kleineren Gegenständen wenigstens mit einfachem Durchtränken mit Kreosot auskommen. Die Entfernung des Paraffin geschieht wie gewöhnlich durch Terpentinöl; unter Umständen empfiehlt es sich jedoch, die Schnitte, nachdem sie auf dem Objectträger noch trocken in Reihen gelegt sind, durch leichte Erwärmung fest zu kleben (wobei man zugleich einen Theil des anhaftenden Paraffins bei Neigung des Glases zusammenlaufen lassen und so entfernen kann), mit einem Deckglase zu versehen und erst dann mit Nelkenöl zu benetzen. Wird dann vorsichtig erwärmt, so lässt sich das gelöste Paraffin mit Fließpapier absaugen, ohne dass die Schnitte sich irgend wie verschieben, nur ist es nöthig, so oft Nelkenöl zutreten zu lassen, als sich noch unter dem Deckglase Strömungen der Paraffinlösung zeigen.

24) Die von CALBERLA und SELENKA angegebenen Methoden zur Einbettung in eine Eiweiß enthaltende Mischung, welche nach dem Schneiden nicht wieder aufgelöst zu werden braucht, haben sich nach den Versuchen, welche in der Zool. Station mit ihnen angestellt wurden, nicht so gut bewährt wie es im Interesse der Sache zu wünschen gewesen wäre. Für Arthropoden und Würmer, bei denen die vielen Körperanhänge es besonders angenehm erscheinen lassen mussten, eine der-

artige Masse zu besitzen, hat es sich ergeben, dass die in Alkohol conservirten Gewebe den Übergang in Wasser und Eiweiß oder auch direct in letzteres, so wie das längere Verweilen in der warmen Flüssigkeit nicht gut vertragen, vielmehr zum Theil erheblich litten, so dass die auf diese Weise gewonnenen Schnitte histologisch nicht mehr brauchbar waren, sondern höchstens noch zur Ermittlung der Lagerungsbeziehungen der einzelnen Organe dienen konnten. Allein für topographische Untersuchungen aber giebt es einfachere Methoden. Es empfiehlt sich da vor Allem die Einbettung in Gummi oder in Gelatine mit nachfolgender Härtung in Alkohol von etwa 80%. Die Gelatine namentlich ist sehr bequemer Verwendung fähig, zumal man sie eben so gut wie in Wasser auch in 50%igem Alkohol quellen lassen und unter Erwärmung lösen, die Schimmelbildung also ausschließen kann. Reines Gummi oder reine Gelatine wird in Harzen so weit durchsichtig, wie erforderlich ist, braucht also nach dem Schneiden, das unter Alkohol von 80% am besten aus freier Hand geschieht, nicht wieder entfernt zu werden. Als Unterlage, auf welche die Objecte mit warmer Gelatine-lösung aufgekittet werden, möchte ich an Stelle des Korkes, des Hollundermarkes oder der Leberstückchen reine Gelatine empfehlen, die ich in besonderer Weise ihrer lästigen Elasticität beraube. Ich lasse sie nämlich wie gebräuchlich in Wasser quellen, löse dann die nassen Tafeln durch Erwärmen, setze $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Volumen Ricinusöl zu, schüttele gut um und gieße kurz vor dem Erkalten die Emulsion in eine Schale. Wenn alsdann durch 90%igen Alkohol alles Öl ausgezogen ist, bleibt die Gelatine als sehr feinporige Masse, als künstliches Hollundermark, zurück und ist sofort schnittfähig. Natürlich darf sie nicht zu lange an der Luft liegen, weil sie dann weich wird. Unter dem Mikroskop wirkt sie nicht störender, als Hollundermark auch, und hat vor diesem voraus, dass sie sich in beliebig großen Stücken herstellen lässt und durchaus gleichmäßig ist. Für andere als topographische Untersuchungen ist sie aber, wie ich nochmals betonen möchte, nicht zu verwenden.

Neapel, Mitte December 1879.
